



# Espacenet

## Bibliographic data: DE 10041215 (A1)

Gegen Procalcitonin gerichtete Antikörper, ihre Herstellung und Verwendung

**Publication date:** 2001-10-04  
**Inventor(s):** ALTHAUS HARALD [DE]; WALTER GOETZ [DE] +  
**Applicant(s):** DADE BEHRING MARBURG GMBH [DE] +  
**Classification:**  
     - **International:** C07K14/585; C07K16/26; (IPC1-7): A61K39/395; C07K16/00;  
     C07K7/08; C12N5/12  
     - **European:** C07K14/585; C07K16/26  
**Application number:** DE20001041215 20000822  
**Priority number (s):** DE20001041215 20000822; DE20001016277 20000403; DE19991062417 19991222  
**Also published as:** • ES 2304340 (T3)

### Abstract of DE 10041215 (A1)

Die Erfindung betrifft gegen Procalcitonin gerichtete Antikörper, ihre Herstellung und Verwendung insbesondere in Therapie und Diagnostik. Die Antikörper sind dadurch gekennzeichnet, dass sie an Procalcitonin nicht jedoch an freies Calcitonin, freies Katakalcin und freies N-Procalcitonin binden.

EPO Machine Translation

Page 1 of 1



### Notice

This automatic translation cannot guarantee full intelligibility, completeness and accuracy [Terms of use](#), [Legal notice](#)

### Abstract DE10041215

The invention relates to antibodies directed against procalcitonin, their preparation and use in particular in therapy and diagnosis. The antibodies are characterized in that they bind to procalcitonin but not to free calcitonin, free kalcalcin and free N-procalcitonin.

D2



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**  
10 **DE 100 41 215 A 1**

51 Int. Cl. 7:  
**C 07 K 16/00**  
C 07 K 7/08  
A 61 K 39/395  
C 12 N 5/12

21 Aktenzeichen: 100 41 215.7  
22 Anmeldetag: 22. 8. 2000  
23 Offenlegungstag: 4. 10. 2001

DE 100 41 215 A 1

56 Innere Priorität:

100 16 277. 0 03. 04. 2000  
199 62 417. 8 22. 12. 1999

71 Anmelder:

Dade Behring Marburg GmbH, 35041 Marburg, DE

72 Erfinder:

Althaus, Harald, 35083 Wetter, DE; Walter, Götz, Dr.,  
35117 Münchhausen, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

54 Gegen Procalcitonin gerichtete Antikörper, ihre Herstellung und Verwendung

57 Die Erfindung betrifft gegen Procalcitonin gerichtete Antikörper, ihre Herstellung und Verwendung insbesondere in Therapie und Diagnostik. Die Antikörper sind dadurch gekennzeichnet, daß sie an Procalcitonin nicht jedoch an freies Calcitonin, freies Katacalcin und freies N-Procalcitonin binden.



1308769635639

100 41 215 A 1

## Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft gegen Procalcitonin gerichtete Antikörper, ihre Herstellung und Verwendung.

[0002] Procalcitonin ("pCT") ist ein aus 116 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 13000 Dalton. Es stellt das Prohormon von Calcitonin dar, welches unter normalen Stoffwechselbedingungen in den C-Zellen der Schilddrüse gebildet und sezerniert wird. Die Synthese von pCT und Calcitonin beginnt mit der Translation eines 141 Aminosäuren umfassenden Vorläuferpeptides, dem Preprocalcitonin ("Pre-pCT"). Die Aminosäuresequenz von menschlichem Pre-pCT wurde 1984 von Moullee et al. in FEBS Letters, 167: 93-97 beschrieben. Nach Abspaltung des Signalpeptides (ersten 25 Aminosäuren von Pre-pCT) entsteht pCT. Bei Gesunden wird durch spezifische Proteolyse aus pCT intrazellulär das Hormon Calcitonin (Aminosäuren 60-91 der pCT-Aminosäuresequenz) sowie das N-Procalcitonin (Aminosäuren 1-57 der pCT-Aminosäuresequenz) und das Katalcain (Aminosäuren 96-116 der pCT-Aminosäuresequenz) gebildet (s. a. Conlon et al. (1988) Biochem. J., 256: 245-250). Das pCT sowie dessen Fragmente wurden insbesondere bei bestimmten Tumorerkrankungen (Ghillani et al. (1989) Cancer Research, 49: 6845-6851) sowie bei Sepsis (EP-B1-0 656 121) und SIRS ("systemic inflammatory response syndrome") (Snider et al. (1997) J. Invest. Med., 45: 552-560) in erhöhter Konzentration im Serum bzw. Plasma von Patienten nachgewiesen.

[0003] Bei der typischen Sepsis werden Bakterien von einem Herd aus ständig oder schubweise in die Blutbahn abgegeben. Die klinischen Erscheinungen werden durch Endotoxin oder durch andere pyrogene und toxische Substanzen in ihrer Interaktion mit Körpermechanismen verursacht. Der akute Einbruch löst Schüttelfrost und in schweren Fällen eine Schockreaktion aus. Sonderformen des septischen Schocks sind das Waterhouse-Friderichsen-Syndrom und das Toxin-schocksyndrom (TSS).

[0004] Das TSS ist als ein akutes Krankheitsbild bei Staphylokokken-Infektionen bekannt, das durch ein spezielles Staphylokokken-Toxin hervorgerufen wird. Eine schwere Sepsis entwickelt sich relativ häufig bei Patienten mit schweren Grunderkrankungen wie z. B. Tumorerkrankungen, schweren Verbrennungen und Traumen.

[0005] Die Bedeutung des Nachweises der Erreger im Blut ("positive Blutkultur, Bakteriämie") ist für die Sepsisdiagnose in den Hintergründen getreten, da in der Regel nur in 20 bis 40% der Sepsisfälle die Blutkultur positiv ist. Der Sepsisbegriff hat sich deshalb einem Wandel unterzogen. Der moderne Begriff "Sepsis" beschreibt ein klinisches Syndrom, welches in der Regel Fieber, Leukozytose, Bewusstseinsveränderungen, einen hyperdynamischen Kreislauf ("warmer Schock") und einen hypermetabolischen Zustand umfaßt, wobei eine positive Blutkultur als Voraussetzung für die Diagnose einer Sepsis nicht mehr erforderlich ist.

[0006] In WO 98/33524 wird vorgeschlagen, Antikörper, die an pCT binden, zur Therapie von Sepsis und SIRS einzusetzen.

[0007] Über lange Jahre wurden polyklonale Antikörper, die durch Immunisierung mit Calcitonin gewonnen wurden, zum Nachweis des sogenannten immunreaktiven Calcitonins, welches neben Calcitonin auch das Procalcitonin und weitere Bruchstücke des Procalcitonins umfaßt, verwendet. Durch die Immunisierung mit synthetischen Peptiden, deren Aminosäuresequenz mit der Sequenz von Teilschnitten des Procalcitonins übereinstimmt, gelang es verschiedene monoklonale Antikörper herzustellen, die an verschiedene Epitope des Calcitonins und Katalcains binden (Ghillani et al. (1988) J. Immunol., 141: 3156-3163).

[0008] Auf Basis dieser Antikörper wurden auch Sandwich-Immunoassays zum Nachweis von pCT bzw. Calcitonin in Serumproben entwickelt. Zum Nachweis von Calcitonin-Vorläufermolekülen wurde eine Kombination eines Anti-Katalcain-Antikörpers mit einem Anti-Calcitonin-Antikörper vorgeschlagen (EP-B1-0 656 121). Eine solche Methode hat jedoch den Nachteil, daß zum pCT-Nachweis mindestens zwei Antikörper, die an möglichst weit auseinanderliegende pCT-Bereiche binden müssen, benötigt werden.

[0009] Für den Fachmann stellt sich daher die Aufgabe, andere spezifische Bindungspartner bereitzustellen, die es erlauben, pCT auch nur mit einem spezifischen Bindungspartner nachweisen zu können.

[0010] Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der erfindungsgemäßen Antikörper gelöst, die an Procalcitonin nicht jedoch an freies Calcitonin, freies Katalcain und freies N-Procalcitonin binden. Bevorzugt sind im Sinne der Erfindung Antikörper, die an ein Peptid mit der Aminosäuresequenz Asp-Ser-Pro-Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly-Ala-Ser-Leu-Ser binden, sowie Antikörper, die an ein Peptid mit der Aminosäuresequenz Val-Gly-Ala-Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Asp-Met-Ser-Ser binden.

[0011] Im Gegensatz zu den bisher bekannten Antikörpern, die pCT und zugleich aber auch freies Calcitonin oder freies Katalcain oder freies N-Procalcitonin binden, können die erfindungsgemäßen Antikörper auch alleine in kompetitiven Testverfahren oder in immunhistochemischen Methoden zum spezifischen pCT-Nachweis eingesetzt werden. Hinzu kommt, daß die erfindungsgemäßen Antikörper zur affinitätschromatographischen Aufreinigung von pCT aus einer Probe, die auch pCT-Spaltprodukte enthält, besonders geeignet sind.

[0012] Obwohl Ghillani et al. bei ihren Immunisierungsversuchen auch Peptide, die die Aminosäuresequenz Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Asp bzw. die Aminosäuresequenz Val-Gly-Ala-Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Asp-Met-Ser-Ser enthalten, eingesetzt haben, gelang ihnen trotz intensiven Bemühens um die Identifizierung der pCT-Epitope nur die Bereitstellung von Antikörpern, die entweder das "reife" Calcitonin oder pCT gemeinsam mit Calcitonin bzw. pCT gemeinsam mit Katalcain erkennen.

[0013] Überraschenderweise ist es nun gelungen, Antikörper zu erzeugen, die an Procalcitonin nicht jedoch an freies Calcitonin, freies Katalcain und freies N-Procalcitonin binden.

[0014] Im folgenden werden spezifische Ausführungsformen der Erfindung näher erläutert:

Ein bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind solche Antikörper, die dadurch gekennzeichnet sind, daß diese Antikörper Procalcitonin nicht jedoch freies Calcitonin, freies Katalcain und freies N-Procalcitonin binden.

[0015] Unter dem Begriff "Antikörper" ist im Sinne dieser Erfindung ein Immunglobulin, z. B. ein Immunglobulin der Klasse bzw. Subklasse IgA, IgD, IgE, IgG, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgM, zu verstehen. Ein Antikörper weist mindestens eine Bindungsstelle (häufig Paratop genannt) für ein Epitop (häufig auch antigene Determinante genannt) auf einem Antigen oder Hapten auf. Ein solches Epitop ist z. B. durch seine räumliche Struktur und/oder durch das Vorhandensein



von polaren und/oder apolaren Gruppen gekennzeichnet. Die Bindungsstelle des Antikörpers ist komplementär zum Epitop. Die Antigen-Antikörper-Reaktion bzw. die Hapten-Antikörper-Reaktion funktioniert nach dem sogenannten "Schlüssel-Schloss-Prinzip", und ist in der Regel in einem hohen Grad spezifisch, d. h. die Antikörper vermögen kleine Abweichungen in der Primärstruktur, in der Ladung, in der räumlichen Konfiguration und der sterischen Anordnung des Antigens oder Haptens zu unterscheiden. Insbesondere die sogenannten "complementary determining regions" des Antikörpers tragen zur Bindung des Antikörpers an das Antigen oder Hapten bei.

[0016] Der Begriff "Antigene" umfaßt monovalente und polyvalente Antigene. Ein polyvalentes Antigen ist ein Molekül oder ein Molekülkomplex, an das/den mehr als ein Immunglobulin gleichzeitig binden kann, während bei einem monovalenten Antigen jeweils nur ein einziger Antikörper zur selben Zeit binden kann. Als Hapten wird üblicherweise ein Molekül bezeichnet, das nicht für sich allein immunogen ist, sondern das zu Immunisierungszwecken üblicherweise an einen Träger gebunden wird.

[0017] Unter dem Begriff Antikörper sind im Sinne dieser Erfindung nicht nur komplette Antikörper zu verstehen sondern ausdrücklich auch Antikörperfragmente, wie z. B. Fab, Fv, F(ab')<sub>2</sub>, Fab'; sowie auch chimäre, humanisierte, bi- oder oligospezifische, oder "single chain" Antikörper; des weiteren auch Aggregate, Polymere und Konjugate von Immunglobulinen und/oder deren Fragmenten, sofern die Bindungseigenschaften an das Antigen oder Hapten erhalten sind. Antikörperfragmente lassen sich beispielsweise durch enzymatische Spaltung von Antikörpern mit Enzymen wie Pepsin oder Papain herstellen. Antikörperaggregate, -polymere und -konjugate können durch vielfältige Methoden generiert werden, z. B. durch Hitzebehandlung, Umsetzung mit Substanzen wie Glutaraldehyd, Reaktion mit immunglobulin-bindenden Molekülen, Biotinylierung von Antikörpern und anschließende Reaktion mit Streptavidin oder Avidin, etc.

[0018] Bei einem Antikörper im Sinne dieser Erfindung kann es sich um einen monoklonalen oder um einen polyklonalen Antikörper handeln. Der Antikörper kann nach den üblichen Verfahren hergestellt worden sein, z. B. durch Immunisierung des Menschen oder eines Tieres, wie z. B. Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Pferd, Schaf, Ziege, Huhn (s. a. Messerschmid (1996) B10forum, 11: 500-502), und anschließender Gewinnung des Antiserums; oder durch Klonierung von Hybridomazellen und der anschließenden Reinigung der sekretierten Antikörper; oder durch Kloneierung und Expression der Nukleotidsequenzen bzw. modifizierter Versionen davon, die die Aminosäuresequenz kodieren, die für die Bindung des natürlichen Antikörpers an das Antigen und/oder Hapten verantwortlich sind.

[0019] Unter "freiem" Calcitonin, Katalcalcin und N-Procalcitonin sind die weiter oben beschriebenen pCT-Spaltprodukte Calcitonin, Katalcalcin und N-Procalcitonin zu verstehen, die in vivo durch Proteolyse von pCT gebildet werden können.

[0020] Ganz bevorzugte Antikörper im Sinne dieser Erfindung sind Antikörper, die an ein Peptid mit der Aminosäuresequenz Asp-Ser-Pro-Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser oder an ein Peptid mit der Aminosäuresequenz Val-Gly-Ala-Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Ser-Met-Ser-Ser binden. Andere bevorzugte Antikörper im Sinne dieser Erfindung sind Antikörper, die an ein Peptid mit der Aminosäuresequenz Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly oder an ein Peptid mit der Aminosäuresequenz Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Ser binden.

[0021] Besonders bevorzugte Antikörper im Sinne dieser Erfindung sind auch die pCT-bindenden Antikörper, die von der Hybridomazelllinie 98-31/04 produziert werden. Diese Hybridomazelllinie wurde am 16.12.1999 bei der DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascherode Weg 1b, Braunschweig, Deutschland, unter der Eingangsnummer DSM ACC2437 hinterlegt.

[0022] Ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung sind spezifische Bindungspartner, die an ein Epitop binden, das von einem erfindungsgemäßen Antikörper erkannt wird.

[0023] Unter einem "spezifischen Bindungspartner" ist ein Mitglied eines spezifischen Bindungspaares zu verstehen. Bei den Mitgliedern eines spezifischen Bindungspaares handelt es sich um zwei Moleküle, die jeweils mindestens eine zu einer Struktur des anderen Moleküls komplementäre Struktur aufweisen, wobei die beiden Moleküle sich über eine Bindung der komplementären Strukturen zu binden vermögen. Der Begriff Molekül umfaßt auch Molekülkomplexe wie z. B. Enzyme, die aus Apo- und Coenzym bestehen, Proteine, die aus mehreren Untereinheiten bestehen, Lipoproteine bestehend aus Protein und Lipiden, etc. Spezifische Bindungspartner können natürlich vorkommende aber auch z. B. mittels chemischer Synthese, mikrobiologischer Techniken und/oder gentechnologischer Verfahren hergestellte Substanzen sein. Zur Illustration des Begriffs spezifischer Bindungspartner, aber nicht als Einschränkung zu verstehend, sind z. B. zu nennen: Thyroxinbindendes Globulin, steroidbindende Proteine, Antikörper, Antigene, Haptene, Enzyme, Lektine, Nukleinsäuren, Repressoren, Oligo- und Polynukleotide, Protein A, Protein G, Avidin, Streptavidin, Biotin, Komplementkomponente C1q, nukleinsäurebindende Proteine, etc. Spezifische Bindungspare sind beispielsweise: Antikörper-Antigen, Antikörper-Hapten, Operator-Repressor, Nuclease-Nukleotid, Biotin-Avidin, Lektin-Polysaccharid, Steroid-steroidbindendes Protein, Wirkstoff-Wirkstoffrezeptor, Hormon-Hormonrezeptor, Enzym-Substrat, IgG-Protein A, komplementäre Oligo- oder Polynukleotide, etc.

[0024] Durch die Bereitstellung der erfindungsgemäßen Antikörper ist es dem Fachmann nun möglich, z. B. durch Konkurrenzexperimente (s. a. Peters et al. (1985) Monoklonale Antikörper, Springer Verlag, Kapitel 12.2 "Epitop-Analyse"), andere spezifische Bindungspartner, Antikörper ausdrücklich miteingeschlossen, zu identifizieren, die an das Epitop eines erfindungsgemäßen Antikörpers binden. So lassen sich, nach dem Fachmann bekannten Techniken mittlerweile mit Hilfe von Phage Display Bibliotheken, aber synthetische Peptidbibliotheken oder mittels "Recombinatorial Antibody Libraries" spezifische Bindungspartner selektieren (Larrick & Fry (1991) Human Antibodies and Hybridomas, 2: 172-189).

[0025] Gegenstand dieser Erfindung ist auch ein erfindungsgemäßer Antikörper oder erfindungsgemäßer spezifischer Bindungspartner, der mit einer Festphase und/oder einer Komponente eines signalbildenden Systems assoziiert ist.

[0026] Der Begriff "Festphase" im Sinne dieser Erfindung beinhaltet einen Gegenstand, der aus porösem und/oder nicht porösem, in der Regel wasserunlöslichem Material besteht und die unterschiedlichsten Formen aufweisen kann, wie z. B. Gefäß, Röhren, Mikrotitrationsplatte, Kugel, Mikropartikel, Stäbchen, Streifen, Filter- oder Chromatographiepapier, etc. In der Regel ist die Oberfläche der Festphase hydrophil oder kann hydrophil gemacht werden. Die Festphase kann aus den unterschiedlichsten Materialien bestehen wie z. B. aus anorganischen und/oder aus organischen Ma-

terialien, aus synthetischen, aus natürlich vorkommenden und/oder aus modifizierten natürlich vorkommenden Materialien. Beispiele für Festphasenmaterialien sind Polymere wie z. B. Zellulose, Nitrocellulose, Zelluloseacetat, Polyvinylchlorid, Polyacrylamid, vernetzte Dextranmoleküle, Agarose, Polystyrol, Polyethylen, Polypropylen, Polymethacrylat oder Nylon; Keramik; Glas; Metalle, insbesondere Edelmetalle wie Gold und Silber; Magnetit; Mischungen oder Kombinationen derselben; etc. Auch Zellen, Liposomen oder Phospholipidvesikel, sind vom Begriff Festphase mitfaßbar.

[0027] Die Festphase kann einen Überzug aus einer oder mehreren Schichten aufweisen, z. B. aus Proteinen, Kohlehydraten, lipophilen Substanzen, Biopolymeren, organischen Polymeren oder Mischungen hiervon, um beispielsweise die unspezifische Bindung von Probenbestandteilen an die Festphase zu unterdrücken oder zu verhindern, oder um beispielsweise Verbesserungen zu erreichen hinsichtlich der Suspensionsstabilität von partikulären Festphasen, der Lagerstabilität, der formgebenden Stabilität oder der Resistenz gegen UV-Licht, Mikroben oder sonstige zerstörend wirkender Agentien.

[0028] Bei einem "signalbildenden System" kann es sich um eine oder mehrere Komponenten handeln, wobei es sich wenigstens bei einer Komponente um ein nachweisbares Label handelt. Als Label ist jedes Molekül zu verstehen, das selbst ein Signal produziert oder die Produktion eines Signals induzieren kann wie z. B. eine fluoreszierende Substanz, eine radioaktive Substanz, ein Enzym, oder eine chemilumineszierende Substanz. Das Signal kann beispielsweise anhand der Enzymaktivität, der Lumineszenz, der Lichtabsorption, der Lichtstreuung, der ausgestrahlten elektromagnetischen oder radioaktiven Strahlung, oder einer chemischen Reaktion nachgewiesen oder gemessen werden.

[0029] Ein Label vermag selbst ein nachweisbares Signal zu erzeugen, so daß keine weiteren Komponenten notwendig sind. Viele organische Moleküle absorbieren ultraviolettes und sichtbares Licht, wobei durch die Lichtabsorption übertragene Energie diese Moleküle in einen angeregten Energiezustand kommen können, und die absorbierte Energie in Form von Licht einer anderen Wellenlänge als der des eingestrahlen Lichts abgeben. Wieder andere Label können direkt ein nachweisbares Signal erzeugen wie z. B. radioaktive Isotope oder Farbstoffe.

[0030] Wieder andere Label benötigen zur Signalerzeugung weitere Komponenten, d. h. das signalproduzierende System schließt in einem solchen Fall all die für die Signalbildung benötigten Komponenten mit ein wie z. B. Substrate, Coenzyme, Quencher, Beschleuniger, zusätzliche Enzyme, Substanzen, die mit Enzymprodukten reagieren, Katalysatoren, Aktivoren, Cofaktoren, Inhibitoren, Ionen etc.

[0031] Geeignete Label (s. a. EP-A2-0 515 194; US 5,340,716; US 5,545,834; Bailey et al. (1987) J. Pharmaceutical & Biomedical Analysis 5: 649-658) sind beispielsweise Enzyme einschließlich Meerrettichperoxidase, alkalische Phosphatase, Glukose-6-Phosphatdehydrogenase, Alkoholdehydrogenase, Glucoseoxidase,  $\beta$ -Galactosidase, Luciferase, Urease und Acetylcholinesterase; Farbstoffe; fluoreszierende Substanzen einschließlich Fluorescein, Isothiocyanat, Rhodamin, Phycocerythin, Phycocyanin, Ethidiumbromid, 5-Dimethylaminonaphthalen-1-sulfonyl und fluoreszierende Chelate von seltenen Erden; chemilumineszierende Substanzen einschließlich Luminal, Isoluminol, Acridiniumverbindungen, Olefin, Enolether, Enamin, Arylimidazol, Lucigenin, Luciferin und Aequeorin; Sensitizer einschließlich Eosin, 9,10-Dibromanthracen, Methylen Blau, Porphyrin, Phthalocyanin, Chlorophyll, Rose Bengal; Coenzyme; Enzymsubstrate; radioaktive Isotope einschließlich  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^5\text{Cr}$ ,  $^{45}\text{Ca}$ ,  $^{70}\text{Co}$  und  $^{125}\text{I}$ ; Partikel einschließlich magnetische Partikel oder Partikel, bevorzugt Latexpartikel, die selbst beispielsweise mit Farbstoffen, Sensitizern, fluoreszierenden Substanzen, chemilumineszierenden Substanzen, Isotopen oder anderen nachweisbaren Labeln markiert sein können; Solpartikel einschließlich Gold- oder Silbersolen; Liposomen oder Zellen, die selbst mit nachweisbaren Labeln markiert sein können; etc.

[0032] Ein signalbildendes System kann auch Komponenten umfassen, die bei räumlicher Nähe miteinander in eine nachweisbare Wechselwirkung treten können, z. B. in Form von Energiespendern und Energieempfängern wie beispielsweise Photosensitizer und chemilumineszierende Substanzen (EP-A2-0 515 194), Photosensitizer und Fluorophore (WO 95/06877), radioaktives  $\text{Iod}^{125}$  und Fluorophore (Udenfriend et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 8672-8676), Fluorophore und Fluorophore (Mathis (1993) Clin. Chem. 39: 1953-1959) oder Fluorophore und Fluoreszenz-Quencher (US 3,996,345).

[0033] Unter einer Wechselwirkung zwischen den Komponenten ist die direkte Übertragung von Energie zwischen den Komponenten, z. B. durch Licht- oder Elektronenstrahlung sowie über kurzlebige reaktive chemische Moleküle, miteinander geschlossen. Ferner umfaßt sind hiervon auch Vorgänge, bei denen die Aktivität einer Komponente durch eine oder mehrere andere inhibiert oder verstärkt wird, beispielsweise die Hemmung oder Steigerung der Enzymaktivität oder die Hemmung, Steigerung oder Veränderung (z. B. Wellenlängenverschiebung, Polarisation) des von der beeinflussten Komponente ausgesendeten elektromagnetischen Strahlung. Die Wechselwirkung zwischen den Komponenten umfaßt auch Enzymkaskaden. In diesem Fall sind die Komponenten Enzyme, von denen mindestens eines das Substrat für ein anderes liefert, so daß eine maximale oder minimale Reaktionsgeschwindigkeit der gekoppelten Substratumsatzung resultiert.

[0034] Eine effektive Wechselwirkung zwischen den Komponenten findet in der Regel statt, wenn diese räumlich benachbart vorliegen, also z. B. innerhalb eines Abstandsreiches von wenigen  $\mu\text{m}$ , insbesondere innerhalb eines Abstandsreiches von unter 600 nm, bevorzugt unter 400 nm, ganz besonders bevorzugt von unter 200 nm.

[0035] Mikropartikel werden häufig als Festphase und/oder als Label genutzt. Unter dem Begriff "Mikropartikel" sind im Sinne dieser Erfindung Teilchen zu verstehen, die einen ungefähren Durchmesser von wenigstens 20 nm und nicht mehr als 20  $\mu\text{m}$  aufweisen, üblicherweise zwischen 40 nm und 10  $\mu\text{m}$ , bevorzugt zwischen 0,1 und 10  $\mu\text{m}$ , besonders bevorzugt zwischen 0,1 bis 5  $\mu\text{m}$ , ganz besonders bevorzugt zwischen 0,15 und 2  $\mu\text{m}$ . Die Mikropartikel können regelmäßig oder unregelmäßig geformt sein. Sie können Kugeln, Spheroide, Kugeln mit mehr oder weniger großen Kavitäten oder Poren darstellen. Die Mikropartikel können aus organischem, aus anorganischem Material oder aus einer Mischung oder Kombination von beiden bestehen. Sie können aus einem porösen oder nicht porösen, einem selbstwähligen oder nicht selbstwähligen Material bestehen. Prinzipiell können die Mikropartikel jegliche Dichte haben, bevorzugt sind jedoch Partikel mit einer Dichte, die der Dichte des Wassers nahekommt wie etwa 0,7 bis etwa 1,5 g/ml. Die bevorzugten Mikropartikel sind in wässrigen Lösungen suspendierbar und möglichst lange suspensionsstabil. Sie mögen durchsichtig, teilweise durchsichtig oder undurchsichtig sein. Die Mikropartikel können aus mehreren Schichten bestehen wie beispielsweise die sogenannten "core-and-shell" Partikel mit einem Kern und einer oder mehreren umhüllenden Schichten.



136979653639

Der Begriff Mikropartikel umfaßt beispielsweise Farbstoffkristalle, Metallsolen, Silica-Partikel, Glaspartikel, Magnetpartikel, Polymerteilchen, Öltröpfchen, Lipidpartikel, Dextran, und Proteinaggregate. Bevorzugte Mikropartikel sind in wässrigen Lösungen suspendierbare und aus wasserunlöslichem Polymermaterial bestehende Partikel, insbesondere aus substituierten Polyethylenen. Ganz besonders bevorzugt sind Latexpartikel z. B. aus Polystyrol, Acrylsäurepolymeren, Methacrylsäurepolymeren, Acrylnitril-Polymeren, Acrylnitril-Butadien-Styrol, Polyvinylacetat-Acrylat, Polyvinylpyridin, Vinylchlorid-Acrylat. Von besonderem Interesse sind Latexpartikel mit reaktiven Gruppen an ihrer Oberfläche wie beispielsweise Carboxyl-, Amino- oder Aldehydgruppen, die eine kovalente Bindung z. B. von spezifischen Bindungspartnern an die Latexpartikel erlauben. Die Herstellung von Latexpartikeln ist beispielsweise in EP 0 080 614, EP 0 227 054 und EP 0 246 446 beschrieben.

[0036] Der Begriff "assoziiert" ist breit zu verstehen und umfaßt beispielsweise eine kovalente und eine nicht-kovalente Bindung, eine direkte und eine indirekte Bindung, die Adsorption an eine Oberfläche und den Einschuß in eine Vertiefung oder einen Hohlraum, etc. Bei einer kovalenten Bindung sind die Antikörper oder Bindungspartner über eine chemische Bindung an die Festphase oder an das Label gebunden. Beispiele für eine nicht-kovalente Bindung sind die Oberflächenadsorption, der Einschuß in Hohlräume oder die Bindung von zwei spezifischen Bindungspartnern. Neben einer direkten Bindung an die Festphase oder das Label können die Antikörper oder Bindungspartner auch indirekt über spezifische Wechselwirkung mit anderen spezifischen Bindungspartnern an die Festphase oder das Label gebunden sein (s. a. EP-A2-0 411 945). Dies soll anhand von Beispielen näher illustriert werden: Der biotinylierte Antikörper kann über labelgebundenes Avidin an das Label gebunden werden; oder es kann ein Fluorescein-Antikörperkonjugat über festphasengebundene Anti-Fluorescein-Antikörper an die Festphase gebunden werden; oder der Antikörper kann über Immunglobulin-bindende Proteine an die Festphase oder das Label gebunden werden.

[0037] Ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung sind erfindungsgemäße Antikörper oder spezifische Bindungspartner, die als ein *in vitro* oder *in vivo* Diagnostikum oder als ein Bestandteil eines *in vitro* oder *in vivo* Diagnostikums verwendet werden.

[0038] Bei einem *in vivo* Diagnostikum wird der erfindungsgemäße Antikörper oder der erfindungsgemäße spezifische Bindungspartner, z. B. mit einem radioaktiven Isotop markiert, einem Lebewesen wie z. B. einem Menschen oder einem Tier appliziert. Er reicht sich bevorzugt in den Organen oder Geweben an, die pCT vermehrt enthalten oder herstellen. Durch die Detektion der Orte mit erhöhter Strahlungsintensität können beispielsweise pCT-produzierende Tumorerde lokalisiert und mit bildgebenden Verfahren räumlich dargestellt werden.

[0039] Bei einem *in vitro* Diagnostikum wird der nachzuweisende Analyt, z. B. Procalcitonin, in einer Probe außerhalb eines lebenden menschlichen oder tierischen Körpers nachgewiesen oder dessen Konzentration oder Menge bestimmt.

[0040] Unter einer "Probe" ist im Sinne der Erfindung das Material zu verstehen, das die nachzuweisende Substanz (Beispiele für den Begriff "Analyt" siehe EP-A2-0 515 194, Seiten 8-15) vermutlich enthält. Der Begriff Probe umfaßt beispielsweise biologische Flüssigkeiten oder Gewebe insbesondere von Menschen und Tieren wie Blut, Plasma, Serum, Sputum, Exsudat, bronchoalveoläre Lavage, Lympheflüssigkeit, Synovialflüssigkeit, Samenflüssigkeit, Vaginalsekret, Feces, Urin, Liquor, Haare, Haut, Gewebeproben oder -schnitte. Ferner werden umfaßt Zellkulturproben, pflanzliche Flüssigkeiten oder Gewebe, forensische Proben, Wasser- und Abwasserproben, Nahrungsmittel, Arzneimittel. Gegebenenfalls müssen die Proben vorbehandelt werden, um den Analyten für das Nachweisverfahren zugänglich zu machen oder um störende Probenbestandteile zu entfernen. Solche Vorbehandlung von Proben mag die Abtrennung und/oder Lyse von Zellen beinhalten, das Präzipitieren, die Hydrolyse oder die Denaturierung von Probenbestandteilen wie z. B. Proteinen, die Zentrifugation von Proben, das Behandeln der Probe mit organischen Lösungsmitteln wie z. B. Alkohole, insbesondere Methanol; das Behandeln der Probe mit Detergenzien. Häufig wird die Probe in ein anderes, meistens wässriges, Medium überführt, welches mit dem Nachweisverfahren möglichst nicht interferieren soll.

[0041] Die erfindungsgemäßen Antikörper und/oder die erfindungsgemäßen spezifischen Bindungspartner können in einem Verfahren zum quantitativen oder qualitativen Nachweis eines Analyten, bevorzugt Procalcitonin, in einer Probe verwendet werden.

[0042] Bei einem quantitativen Nachweis wird die Menge oder die Konzentration des Analyten in der Probe gemessen. Von dem Begriff des "quantitativen Nachweises" sind auch semiquantitative Methoden umfaßt, die nur die ungefähre Menge oder Konzentration des Analyten in der Probe erfassen oder nur zu einer relativen Mengen- oder Konzentrationsangabe dienen können. Unter einem qualitativen Nachweis ist der Nachweis des Vorhandenseins des Analyten in der Probe überhaupt oder das Anzeigen, daß die Konzentration des Analyten in der Probe unterhalb oder oberhalb eines bestimmten oder mehrerer bestimmter Schwellenwerte liegt, zu verstehen.

[0043] pCT läßt sich beispielsweise mit den erfindungsgemäßen Antikörpern und/oder den erfindungsgemäßen spezifischen Bindungspartnern immunhistochemisch in Zellausstrichen, Gewebeschnitten oder Gewebeproben nachweisen. So werden beispielsweise von dem zu untersuchenden Gewebe Gefrierschnitte oder Paraffinschnitte angefertigt. Die Schnitte werden mit den erfindungsgemäßen Antikörpern unter geeigneten Reaktionsbedingungen inkubiert. Nach Auswaschen der nichtgebundenen erfindungsgemäßen Antikörper werden die Bereiche, an die die erfindungsgemäßen Antikörper gebunden haben, detektiert. Dies kann ohne weitere Zwischenschritte erfolgen, wenn die Antikörper z. B. mit Fluoreszenzlabeln versehen sind. Alternativ können die gebundenen erfindungsgemäßen Antikörper beispielsweise mit Hilfe von entsprechenden spezifischen, mit einem Label assoziierten Bindungspartnern, die an die gebundenen erfindungsgemäßen Antikörper binden können, detektiert werden.

[0044] Der Nachweis von pCT mit den erfindungsgemäßen Antikörpern und/oder den erfindungsgemäßen spezifischen Bindungspartnern kann beispielsweise auch mit Verfahren erfolgen wie beispielsweise: Western Blot, Dot Blot, Immunoelektrophorese, Immunfixations-Elektrophorese, Elektroimmundiffusion, Immunpräzipitation, radiale Immundiffusion, Immuninhibition, Immunchromatographie, Latex-Agglutination, turbidimetrischer oder nephelometrischer Test, homogener oder heterogener Bindungstest, Ein- oder Zweischritt-Test, Sandwich-Test, indirekter Test, kompetitiver Test, "point-of-care"-Teste, etc. Diese und andere Nachweisverfahren sind beispielsweise in "Labor und Diagnose", ed. L. Thomas, Thi-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt, 1998, Kapitel 60, oder in "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques", ed. T. Chard, Elsevier, Amster-

dann, 1987, beschrieben.

[0045] Bei Bindungstesten wird der Analyt, soweit in der Probe vorhanden, an einen oder mehrere analyt-spezifische Bindungspartner gebunden, und es bilden sich Analyt-analyt-spezifische(r) Bindungspartner-Komplexe aus.

[0046] Bei homogenen Bindungstesten erfolgt keine Trennung zwischen freien und komplexgebundenen Analyten. Beispiele für homogene Immunoassays (s. a. Boguslaski & Li (1982) Applied Biochemistry and Biotechnology, 7: 401-414) sind viele turbidimetrische oder nephelometrische Methoden, wobei die zum Nachweis verwendeten spezifischen Bindungspartner mit Latexpartikel assoziiert sein können; EMT<sup>®</sup>-Teste; CEDIA<sup>®</sup>-Teste; Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassays; Luminescent Oxygen Channeling Immunoassays (EP-A2-0 515 194; Ullman et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci., 91: 5426-5430; Ullman et al. (1996) Clinical Chemistry, 42: 1518-1526); etc.

[0047] Heterogene Bindungsteste sind durch einen oder mehrere Trennungsschritte und/oder Waschschritte gekennzeichnet. Die Trennung kann beispielsweise durch Immunfällung, Fällung mit Substanzen wie Polyethylenglykol, oder Ammoniumsulfat, Filtration, magnetische Abtrennung, Anbindung an eine Festphase wie z. B. an ein Röhrchen, an eine Kugel, an eine Mikrotitrationsplattenvertiefung, oder an ein Filter- oder Chromatographiepapier, erfolgen. Bei heterogenen Bindungstesten ist häufig ein spezifischer Bindungspartner mit einer Komponente eines signalbildenden Systems und ein spezifischer Bindungspartner mit einer Festphase assoziiert (betreffend indirekter Bindung s. a. EP-A2-0 411 945). Es kann sich hierbei um unterschiedliche oder um die gleichen spezifischen Bindungspartner handeln, z. B. kann ein Analyt-spezifischer monoklonaler Antikörper sowohl als Fänger (z. B. als Festphasenantikörper) als auch als markierter Antikörper eingesetzt werden, wenn der Analyt mehr als ein Epitop aufweist.

[0048] Bei heterogenen Sandwich-Testen wird der Analyt üblicherweise von einem Festphasen-assoziierten spezifischen Bindungspartner und einem spezifischen Bindungspartner, der mit einer Komponente eines signalbildenden Systems assoziiert ist, gebunden. Bei den spezifischen Bindungspartnern kann es sich im Fall eines Sandwich-Immunoassays um Analyt-spezifische Antikörper handeln oder, wenn der Analyt selbst ein Antikörper ist, um das Antigen und/oder um ein "modifiziertes Antigen", z. B. einem gelabelten Antigen, einem Antigenstück, einem Antigenanalogen. Beispiele für solche Sandwichkomplexe sind: Festphase-Antikörper < Analyt < Antikörper-Label oder Festphase-Antigen < Analyt (= Antikörper) < Antigen-Label.

[0049] Eine andere Ausführungsform eines heterogenen Immunoassays ist der indirekte Immunoassay: Der Analyt ist in diesem Fall ein Antikörper. Einer der spezifischen Bindungspartner ist dessen Antigen und/oder ein modifiziertes Antigen und der andere spezifische Bindungspartner ist ein Antikörper, der den Analyten bindet, und/oder ein Immunglobulin-bindendes Protein. Beispiele für solche Komplexe, die bei einem indirekten Immunoassay gebildet werden können, sind: Festphase-Anti-IgM-Antikörper < Analyt (= Anti-Hbs Ag-IgM) < HbsAg-Label oder Festphase-HbsAg < Analyt (= Anti-Hbs Ag-IgG) < Protein A-Label.

[0050] Bei einem heterogenen kompetitiven Immunoassay konkurriert der Proben-Analyt mit einem "modifizierten Analyten", z. B. einem gelabelten Analyten, einem Analytstück, einem Analytanalogen, etc., um eine limitierte Anzahl Analyt-spezifischer Bindungsstellen. Beispiele zur Illustration des Prinzips: (i) Proben-Analyt konkurriert mit einem Analyt, der mit einer Komponente eines signalbildenden Systems assoziiert ist, um die Bindung an Festphasen-assoziierte Analyt-spezifische Antikörper oder (ii) Proben-Analyt konkurriert mit Festphasen-assoziiertem Analyt um die Bindung an Analyt-spezifische Antikörper, die mit einer Komponente eines signalbildenden Systems assoziiert sind.

[0051] Sandwich-Teste, kompetitive Teste und indirekte Teste können auch als homogene Testverfahren durchgeführt werden (s. a. EP-A2-0 515 194).

[0052] Der Begriff "point-of-care-Teste" oder "POC-Teste" ist breit zu verstehen. Er schließt Teste ein, bei denen kein separates Analyse- oder Meßgerät zur Testdurchführung oder Testauswertung benötigt wird. POC-Teste basieren in vielen Fällen auf immunochromatographische Verfahren, Immunkomplexabtrennungen per Filtration und/oder Immunfixationstechniken. Die POC-Teste sind insbesondere für Messungen vor Ort, z. B. am Krankenbett oder daheim, für den Notarzt und/oder beim niedergelassenen Arzt und weniger für das Großlabor gedacht. POC-Teste können insbesondere auch von Personen, die keine eingehende medizinisch-technische Ausbildung und Erfahrung auf dem Gebiet der Laboratoriumsmedizin haben, durchgeführt werden. Unter der Begriff "POC-Teste" sind im Sinne dieser Erfindung auch sogenannte Heimteste oder OTC-Teste zu verstehen, die von medizinischen Laien durchgeführt werden dürfen, so z. B. die diversen Schwangerschaftsteste die für den Heimgebrauch vertrieben werden. Andere POC-Teste betreffen beispielsweise den Nachweis von Herzinfarktmarkern, Drogen, Arzneimitteln, Infektions- und Entzündungsmarkern. Bei vielen POC-Testen sind oder werden im Laufe der Testdurchführung spezifische Bindungspartner an oder auf Filter- oder Chromatografiestreifen oder -scheiben assoziiert. Eine positive oder negative Nachweisreaktion kann zum Beispiel mit dem Erscheinen oder Nichterscheinen einer Farbbande in einem bestimmten Testfeld verknüpft sein und/oder dem Erscheinen oder Nichterscheinen eines bestimmten Symbols, z. B. einem "+", einem "-" und/oder der Intensität des jeweiligen Meßsignals.

[0053] Ein POC-Test für pCT kann beispielsweise so aufgebaut sein: Probe und gelabelte Antikörper, die an pCT zu binden vermögen, werden auf einen Teststreifen aufgetragen. Geeignete Label sind z. B. gefärbte Latexpartikel, kolloidales Gold, Enzyme, etc. Sofern pCT in der Probe enthalten ist, werden sich pCT-Antikörperkomplexe ausbilden. Diese Komplexe bewegen sich mittels Kapillarkraft in Richtung auf einen Bereich, in dem Antikörper, die an andere pCT-Epitope zu binden vermögen, z. B. in Form einer Bande fixiert sind oder im Laufe des Testverfahrens fixiert werden (z. B. über eine Biotin-Avidin-Brücke). Die gelabelten pCT-Antikörperkomplexe werden in diesem Bereich gebunden und bilden mit den fixierten Antikörpern einen Sandwichkomplex aus. Die Intensität des Labelsignals ist hier proportional zur pCT-Probenkonzentration. Bei einem kompetitiven POC-Testverfahren können beispielsweise pCT und/oder pCT-Fragmente in einem Bereich des Teststreifens fixiert sein oder im Laufe des Testverfahrens fixiert werden. Dieses fixierte pCT würde mit pCT aus der Probe um die Bindung an gelabelte anti-pCT-Antikörper konkurrieren. Alternativ können auch fixierte anti-pCT-Antikörper und gelabeltes pCT für den Aufbau eines kompetitiven pCT-Testes eingesetzt werden.

[0054] Eine besonders bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist ein nephelometrischer oder ein turbidimetrischer Test, insbesondere ein solcher Test bei dem erfindungsgemäße Antikörper und/oder erfindungsgemäße spezifische Bindungspartner - bevorzugt an Latexpartikel assoziiert - eingesetzt werden.



1309769535639

[0055] Ein anderer erfindungsgemäßer Gegenstand ist ein Testkit, der einen oder mehrere der erfindungsgemäßen Antikörper und/oder einen oder mehrere der erfindungsgemäßen spezifischen Bindungspartner enthält. In einem solchen Kit sind üblicherweise alle oder nur einige Komponenten eines Testes in abgepackter Form enthalten. Die erfindungsgemäßen Antikörper und die erfindungsgemäßen spezifischen Bindungspartner können beispielsweise mit einer oder mehreren Festphasen und/oder einer oder mehreren Komponenten eines signalbildenden Systems assoziiert sein. Der Testkit kann beispielsweise Standards; Kontrollen; sowie andere Reagenzien, wie z. B. Puffer, Waschlösungen, Meßsignal-auslösende Lösungen und/oder Enzymsubstrat; Küvetten; Pipetten und/oder Testanweisungen enthalten. Eine besonders bevorzugter erfindungsgemäßer Testkit enthält an Latexpartikel assoziierte erfindungsgemäße Antikörper.

[0056] Die erfindungsgemäßen Antikörper und erfindungsgemäßen spezifischen Bindungspartner lassen sich auch für die Affinitätschromatographie verwenden. Unter dem Begriff "Affinitätschromatographie" ist eine Methode zur Reinigung und Isolierung von Substanzen, insbesondere Biopolymeren, zu verstehen, die auf der Tatsache beruht, daß viele Substanzen mit für sie spezifischen Bindungspartnern eine selektive, nichtkovalente, reversible Bindung eingehen können. Das Prinzip des Verfahrens besteht darin, daß der spezifische Bindungspartner an eine unlösliche Matrix (z. B. poröse Gläser, Gele auf Agarose-, Cellulose-, Dextran-, Polymer- und Kieselgelbasis) in der Regel kovalent gebunden und in Kontakt mit einer die Substanz enthaltenden Probe gebracht wird. Die gesuchte Substanz wird wegen ihrer spezifischen Wechselwirkung mit dem Matrix-gebundenen spezifischen Bindungspartner immobilisiert und zurückgehalten, während alle anderen in der Probe enthaltenen Substanzen durch Elution abgetrennt werden. Anschließend wird das gesuchte Biopolymer mit einem geeigneten Elutionsmittel, das die nichtkovalente Bindung zwischen Substanz und spezifischen Bindungspartner auflöst, von der Matrix abgelöst (s. a. B. Buddecke (1989) Grundrisse der Biochemie, Walter de Gruyter, Kapitel 7 "Proteine").

[0057] Ein anderer Gegenstand dieser Erfindung umfaßt erfindungsgemäße Antikörper und/oder erfindungsgemäße spezifische Bindungspartner in einem pharmazeutisch verträglichen, sterilen Injektionsmedium. Unter einem pharmazeutisch verträglichen, sterilen Injektionsmedium ist beispielsweise eine keimfreie, pyrogenfreie Lösung, z. B. Saline oder eine andere Elektrolytlösung, zu verstehen wie sie üblicherweise zur intravenösen, intramuskulären, intraperitonealen oder subkutanen Verabreichung von Arzneimitteln, Impfstoffen oder Kontrastmitteln verwendet wird.

[0058] Wieder ein anderer Gegenstand dieser Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Antikörper und/oder der erfindungsgemäßen spezifischen Bindungspartner als Diagnostikum, als Bestandteil eines Diagnostikums, als Arzneimittel oder als Bestandteil eines Arzneimittels. Von der Erfindung miteingeschlossen ist auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Antikörper und/oder der erfindungsgemäßen spezifischen Bindungspartner zur Behandlung der SIRS ("systemic inflammatory response syndrome"), der Sepsis und/oder Tumore, insbesondere bösartige pCT-produzierende Tumore. SIRS ist eine systemische, entzündliche Antwort auf eine Gewebeschädigung mit den Zeichen einer entfernt ablaufenden Organfunktionsstörung. Ferner wird von der Erfindung umfaßt ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, beispielsweise zur Behandlung von Tumoren, der Sepsis und/oder der SIRS, enthaltend die erfindungsgemäßen Antikörper und/oder die erfindungsgemäßen spezifischen Bindungspartner.

[0059] Die erfindungsgemäßen Antikörper und/oder die erfindungsgemäßen spezifischen Bindungspartner können zur Behandlung intrakorporal oder auch extrakorporal eingesetzt werden. Die erfindungsgemäßen Antikörper und/oder die erfindungsgemäßen spezifischen Bindungspartner können durch radioaktive Isotope und/oder durch die Anbindung pharmakologisch wirksamer Substanzen in ihrer Wirksamkeit verstärkt werden. Die therapeutische Applikation von anti-pCT-Antikörpern ist in WO 98/33524 näher erläutert. Darüber hinaus könnte pCT aus dem Blut eines Patienten beispielsweise auch mit einem Dialyse-analoges Verfahren entfernt werden, wobei das Blut oder das Plasma extrakorporal mit sterilen und fixierten erfindungsgemäßen Antikörpern und/oder erfindungsgemäßen spezifischen Bindungspartnern in Kontakt gebracht wird.

[0060] Ein anderer Gegenstand dieser Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Antikörpers, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß zur Immunisierung ein oder mehrere Peptide verwendet werden, die die Aminosäuresequenz Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly, bevorzugt die Aminosäuresequenz Asp-Ser-Pro-Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser, und/oder die Aminosäuresequenz Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Asp, bevorzugt die Aminosäuresequenz Val-Gly-Ala-Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Asp-Met-Ser-Ser, enthalten. Bei einem bevorzugten erfindungsgemäßen Verfahren ist mindestens eines der zur Immunisierung verwendeten Peptide ein Oligopeptid, vorzugsweise ein trägegebundenes Oligopeptid. Ein anderes bevorzugtes Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Antikörpers umfaßt die Verwendung eines oder mehrerer Peptide mit der Aminosäuresequenz Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly, der Aminosäuresequenz Asp-Ser-Pro-Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser, der Aminosäuresequenz Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Asp-Met-Ser-Ser und/oder der Aminosäuresequenz Val-Gly-Ala-Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Asp-Met-Ser-Ser zur Immunisierung, wobei diese Peptide auch trägegebunden sein können. Die erfindungsgemäßen Antikörper können auch hergestellt werden, durch die Verwendung von natürlich vorkommenden und/oder rekombinanten pCT als Immunisierungsantigen. Des weiteren können auch Peptide zur Immunisierung verwendet werden die eine oder mehrere der folgenden Aminosäuresequenzen Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly, Asp-Ser-Pro-Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser, Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Asp und/oder Val-Gly-Ala-Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Asp-Met-Ser-Ser repetitiv enthalten, beispielsweise Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly-Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly oder Asp-Ser-Pro-Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly-Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly oder Asp-Ser-Pro-Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Asp-Ser-Pro-Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Val-Gly-Ala-Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Asp-Met-Ser-Ser-Val-Gly-Ala-Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Asp-Met-Ser-Ser.

[0061] Der Begriff "Peptide" im Sinne dieser Erfindung umfaßt Säureamide, die bei Hydrolyse in Aminosäuren zerfallen, beispielsweise Aminosäurepolymere wie z. B. Polypeptide, Oligopeptide, Proteine oder Proteinfragmente. Sind nicht mehr als zehn Aminosäuren miteinander verknüpft, so spricht man in der Regel von Oligopeptiden, darüber hinaus von Polypeptiden. Oligopeptid gemäß Definition dieser Erfindung umfaßt auch noch Aminosäureketten von bis zu etwa 20 Aminosäuren.

[0062] Ein Gegenstand dieser Erfindung sind auch die beiden Oligopeptide mit der Aminosäuresequenz Asp-Ser-Pro-Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser und der Aminosäuresequenz Val-Gly-Ala-Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Asp-Met-Ser-Ser. Diese Peptide können als Immunisierungsantigen zur Herstellung der erfindungsgemäßen Antikörper verwendet



werden.

[0063] Die als Immunisierungsantigen verwendeten Peptide können ungebunden und/oder trägergebunden zur Immunisierung verwendet werden. Typische Träger sind beispielsweise Proteine, wie z. B. Ovalbumin, Albumin oder Hämocyanin, oder Polymere, wie z. B. Polyethylenglykol, Polyacrylamid oder Poly-D-Glutamin-D-Lysin. Die Peptide können beispielsweise mit Hilfe von Carbodimid oder Glutaraldehyd an diese Träger gebunden werden oder auch mittels eines bifunktionalen Reagenzes, welches auch als Abstandhalter ("Spacer") wirken kann (Beispiele und Kopplungsmethoden s. z. B. Wong S. (1993) *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*, CRC Press, Inc. Boca Raton).

[0064] Das Immunisierungsantigen kann beispielsweise in Phosphat-gepufferter Saline aufgenommen werden und mit Freund'schem Adjuvans versetzt werden. Diese Emulsion kann dann z. B. intradermal, intraperitoneal und/oder subkutan einem Tier, beispielsweise einem Kaninchen, einer Maus, einer Ratte, einem Meerschweinchen, einem Pferd, einem Schaf, einer Ziege, einem Huhn, etc., appliziert werden. Booster-Injektionen, wobei das Immunisierungsantigen auch mit inkomplettem Freund'schem Adjuvans emulgiert sein kann, können helfen, die Immunantwort zu steigern.

[0065] Erfindungsgemäße polyklonale Antikörper können aus dem Antiserum der immunisierten Tiere gewonnen werden und können per Affinitätschromatographie über eine Matrix, an die beispielsweise pCT oder die als Immunisierungsantigen eingesetzten Peptide gebunden wurden, weiter aufgereinigt werden.

[0066] Um erfindungsgemäße monoklonale Antikörper zu erzeugen, werden nach den allgemein bekannten Verfahren (s. z. B. Harlow & Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor; Peters et al. (1985) *Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung*, Springer Verlag) die Immunzellen immunisierter Tiere, wie z. B. einer Maus, mit Myelomzellen zum Erzeugen von monoklonalen Antikörper ("MAK") produzierenden Hybridoma-Zellen verschmolzen und anschließend geeignete Klone isoliert. Die Auswahl der gewünschten MAK produzierenden Klone wird mit Hilfe spezifischer Screeningverfahren durchgeführt. Hierbei wird die Bindungsspezifität der in den Zellkulturüberstand abgegebenen Antikörper z. B. an das Immunisierungsantigen, an einen etwaigen Träger des Immunisierungsantigens, an pCT, an freies Calcitonin, freies Kalcacalcin und freies N-Procalcitonin, beispielsweise mittels Enzymimmunoassays, Radioimmunoassays und/oder Western Blots überprüft. Hybridome, die erfindungsgemäße Antikörper herstellen, werden kloniert. Die so gewonnenen Hybridoma-Zelllinien stehen dann für eine dauerhafte MAK-Produktion zur Verfügung. Größere Antikörpermengen fassen sich beispielsweise aus Zellkulturüberstand, insbesondere aus Fermentern oder Rollerulturen, sowie aus Aszites gewinnen.

[0067] Je nach gewünschtem Verwendungszweck ist es vorteilhaft nur Teile der Antikörper, wie z. B. Fab-, F(ab')<sub>2</sub>- oder Fab'-Fragmente, einzusetzen. Diese können beispielsweise mit den dem Fachmann bekannten enzymatischen Spaltverfahren (s. a. z. B. Harlow & Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor) erzeugt werden.

[0068] Die Antigenbindungsstellen eines Antikörpers befinden sich in den sogenannten variablen Domänen, die durch die V-Gene kodiert sind. Mit den bekannten gentechnischen Methoden (s. z. B. Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 2<sup>nd</sup> edition; McCafferty et al. (1990) *Nature* 348: 552-554) kann auch die entsprechende Nukleinsäuresequenz eines erfindungsgemäßen Antikörpers ermittelt werden sowie dadurch auch die entsprechende Aminosäuresequenz, sofern diese noch nicht per Aminosäuresequenzierung bereits bekannt war. Als Ausgangsmaterial für derartige Analysen können die Hybridomazellen bzw. die Antikörper produzierenden Immunzellen immunisierter Tiere eingesetzt werden.

[0069] In Kenntnis der Nuklein- und/oder Aminosäuresequenz können mit Hilfe üblicher gentechnologischer und molekularbiologischer Methoden (s. a. Johnson & Chiswell (1993) *Current Opinion in Structural Biology*, 3: 564-571) man humanisierte, chimäre, bi- oder oligospezifische Antikörper sowie von der "complementarity determining region" abgeleitete Peptide ("minimal recognition units"), single-chain Fragmente, und/oder funktionelle Fusionsprodukte, z. B. rekombinant hergestellte Antikörper-Enzym-Konstrukte, hergestellt werden (s. z. B. Larick & Fry (1991) *Human Antibodies and Hybridomas*, 2: 172-189; Kitano et al. (1986) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24: 282-286; Thompson et al. (1986) *J. Immunol. Methods*, 94: 7-12), die an Procalcitonin nicht jedoch an freies Calcitonin, freies Kalcacalcin und freies N-Procalcitonin binden. Mit solchen unter dem Begriff "Antikörper" eingeschlossenen Peptiden kann beispielsweise eine Verringerung der Immunogenität und/oder eine verstärkte Wirksamkeit bei Verabreichung als Arzneimittel oder in vivo Diagnostikum erzielt werden und/oder es ergeben sich Vorteile für den Einsatz als oder in einem in vitro Diagnostikum. Die Antikörper sind auch herstellbar ggf. unter Zuhilfenahme gentechnologischer Methoden in pflanzlichen - wie z. B. Hefezellen - (Fischer et al. (1999) *Biol. Chem.*, 380: 825-839; Hiatt et al. (1992) *Genetic Engineering*, 14: 49-64), tierischen und prokaryontischen Zellen (s. z. B. WO 95/25172) sowie isolierten menschlichen Zellen.

[0070] Ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung sind auch tierische, pflanzliche oder prokaryontische Zellen sowie isolierte menschliche Zellen, die einen erfindungsgemäßen Antikörper produzieren. Eine bevorzugte Ausführungsform dieser Erfindung umfaßt Hybridomazelllinien, die die erfindungsgemäßen Antikörper produzieren, beispielsweise die Hybridomazelllinie 98-31/04. Diese Hybridomazelllinie wurde am 16.12.1999 bei der DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, Braunschweig, Deutschland, mit der Eingangsnummer DSM ACC2437 hinterlegt.

[0071] Fig. 1 stellt eine schematische Darstellung von humanem pCT und dessen proteolytische Spaltprodukte dar; AS = Aminosäure(n).

[0072] Die im folgenden beschriebenen Beispiele dienen zur exemplarischen Beleuchtung einzelner Aspekte dieser Erfindung und sind nicht als Einschränkung zu verstehen.

## Beispiele

## Beispiel 1

## Peptidsynthese

[0073] Zwei Peptide "P1" und "P2" entsprechend den Aminosäuren 53-64 und 88-99 des humanen Procalcitonins (s. a. Fig. 2) mit der Sequenz:

P1: Asp-Ser-Pro-Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser

P2: Val-Gly-Ala-Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Asp-Met-Ser-Ser

wurden wie folgt synthetisiert:

P1 und P2 werden an einem Applied Biosystem, Model 431A Peptidsynthesizer mit 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) Aminosäurenchemie synthetisiert. Die vorhandenen Schutzgruppen wurden durch Behandlung mit Trifluoressigsäure abgespalten.

## Beispiel 2

## Kopplung der Peptide an einen Träger

[0074] Die Peptide wurden an Rinderserum-Albumin (RSA, Centeon Pharma, Marburg, Germany) gekoppelt (s. a. Rusin et al. (1992) Biosens. Bioelectron., 7: 367-373; Kitagawa et al. (1983) J. Biochem., 94: 1165-1172).

[0075] Im einzelnen: 100 mg RSA werden in 20 ml 0,1 M Lithium-Borat-Puffer pH 8,0 mit 41,8 mg N-gamma-Maleimidobutyryloxysuccinimide (GMBs) (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, Deutschland) versetzt und 30 Minuten bei 20°C inkubiert. Anschließend wird das Reaktionsgemisch gegen 0,1 M NaH<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>) pH 6,0 ungepuffert (RSA-GMBs-Lösung).

[0076] 17,5 mg P1 oder P2 werden in 1,75 ml 0,1 M Lithium-Borat-Puffer pH 8,0 gelöst, und 2,1 mg S-acetylmercaptobornsteinsäure-anhydrid (Fluka Chemie-GmbH, Deisenhofen, Deutschland) gelöst in Dioxan (22,2 mg/ml) zugegeben und 30 Minuten bei 20°C inkubiert. Anschließend werden 475 µl 1 M Hydroxylamin-Lösung zugesetzt und weitere 15 Minuten bei 20°C inkubiert. Das erhaltene Reaktionsgemisch wird mit 16 ml RSA-GMBs-Lösung versetzt und 2 Stunden bei 20°C inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von 0,1 M N-ethylmaleimid-Lösung abgestoppt und gegen Phosphat-gepufferte Saline pH 7,2 ungepuffert.

## Beispiel 3

## Herstellung von monoklonalen Antikörpern

## a) Immunisierung von Mäusen

[0077] BALB/c Mäuse wurden jeweils mit 20 µg P1-RSA-Konjugat bzw. 20 µg P2-RSA-Konjugat in kompletten Freund'schen Adjuvans intraperitoneal immunisiert. Nach 4 Wochen erfolgte ein Booster mit jeweils 20 µg P1-RSA-Konjugat bzw. 20 µg P2-RSA-Konjugat in inkompletten Freund'schen Adjuvans (Fa. ICN Biomedical GmbH, Eschwege, Deutschland) und nach 8 Wochen mit jeweils 20 µg P1-RSA-Konjugat bzw. 20 µg P2-RSA-Konjugat ohne Freund'schen Adjuvans. Die letzten 3 Tage vor der Fusion wurden die Mäuse intravenös mit jeweils 20 µg P1-RSA-Konjugat bzw. 20 µg P2-RSA-Konjugat geboostert.

## b) Fusion

[0078] Nach dem Töten der Mäuse durch CO<sub>2</sub>-Inhalation wurden die Milzen entnommen und Einzelzellsuspensionen in serumfreien Dulbeccos modifiziertem Eagle Medium (DMEM, Fa. CC Pro GmbH, Neustadt/W. Deutschland) hergestellt. Die Zellen wurden zentrifugiert (652 g) und 2 x in DMEM gewaschen. Anschließend wurde die Zellzahl mittels Trypanblau-Färbung bestimmt. Zu etwa 10<sup>6</sup> Milzzellen wurden 2 x 10<sup>7</sup> Myelomzellen (Sp2/0) gegeben. Nach dem Zentrifugieren (360 g) wurde der Überstand verworfen, 1 ml Polyethylenglycol-Lösung (PEG 4000, Fa. Merck Eurolab, Bruchsal, Deutschland; ca. 50%ig in DMEM) auf das Zellpellet gegeben und nach Resuspension 1 Minute bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde tropfenweise ca. 10 ml DMEM zugegeben und 2 bis 4 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die fusionierten Zellen wurden abzentrifugiert (326 g) und das Pellet in DMEM + 20% FKS (fötales Kälberserum, Fa. Biowithaker Europe, Verviers, Belgien) + IAT-Lösung (Fa. CC Pro GmbH, Neustadt/W. Deutschland) resuspendiert und in 24 Well-Zellkulturplatten (Fa. Costar) abgefüllt. Die ungefähre Zellkonzentration pro Well betrug 5 x 10<sup>5</sup> bis 5 x 10<sup>6</sup> Zellen.

[0079] 2-3 Wochen später wurden die entstandenen Zellkolonien (Hybride) entnommen und in neue Kulturplatten überführt.

## c) Bestimmung der Antikörperspezifität

[0080] Die Spezifität der in die Zellkultur abgegebenen Antikörper wurden in einem ersten Testschritt mit Hilfe von Immunisierungsantigen-beschichteten Mikrotiterplatten (Fa. Nunc, Typ B), Beschichtung 0,2 µg/ml ≈ 0,003 µg/Vertiefung, getestet.

[0081] In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 100 µl Zellkulturüberstand (Verdünnung 1 : 2) pipettiert und 1 Stunde bei +15 bis +25°C inkubiert. Nach zweimaligen Waschen der Platte mit Waschlösung-POD (OSEW; Fa. Dade

# DE 100 41 215 A 1

Behring, Marburg, Deutschland) wurden in jede Vertiefung 100 µl anti-Maus IgG/F(ab)<sub>2</sub>-POD-Konjugat (Fa. Dade Behring, Marburg, Deutschland) eingefüllt und 1 Stunde bei +15 bis +25°C inkubiert. Nach weiterem zweimaligen Waschen der Platte wurde in jede Vertiefung 100 µl Chromogen TMB-Lösung (Fa. Dade Behring, Marburg, Deutschland) eingefüllt und weitere 30 Minuten bei +15 bis +25°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde in jede Vertiefung 100 µl Stopp-Lösung POD (Fa. Dade Behring, Marburg, Deutschland) eingefüllt und die Mikrotiterplatte am BEP II (Behring-ELISA-Prozessor II, Fa. Dade Behring, Marburg, Deutschland) bei 450 nm ausgewertet.

[0082] In einem 2. Testschritt wurden die Hybride wie oben beschrieben überprüft mit Hilfe von Mikrotiterplatten (Fa. Nunc, Typ B), die mit folgenden Peptiden beschichtet waren:

- i. Rekombinantes humanes pCT (0,03 µg/Vertiefung). Die Herstellung von rekombinanten pCT ist im Detail in der am 22. Dezember 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt parallel eingereichten Anmeldung mit dem Titel "Humanes Procalcitonin, dessen Herstellung und Verwendung" beschrieben (Aktenzeichen 199 62 434.8). Ein zur Expression von pCT in E. coli geeignetes Plasmid wurde am 16.12.1999 bei der DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH unter der Nummer DSM 13203 hinterlegt. Dieses Plasmid kann mittels Standardmethoden (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, 1997) in einen geeigneten E. coli Stamm (z. B. JM109; Stratagene, LaJolla, USA) transformiert werden. Klone können nach Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten, welche 50 µg/ml Ampicillin als Selektionsmedium enthalten, gewonnen werden. Die Expression des Procalcitonins kann nach folgendem Prozedere erfolgen: Frisch mit dem Expressionsplasmid transformierte JM109 werden über Nacht bei 37°C unter Schütteln in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angezogen und dann 1 : 50 in 1 l frischem LB-Medium (Ampicillin 100 µg/ml) verdünnt und weiter bei 37°C geschüttelt, und bei einer OD<sub>600</sub> von 0,4 mit 2 mM IPTG für 3 h induziert. Bei Einhaltung dieser optimierten Bedingungen wurden reproduzierbar ca. 13 mg Fusionsprotein aus 1 l Kultur nach einer Reinigung unter nativen Bedingungen über Metallaffinitätschromatographie nach Angaben des Herstellers (Talon Metal Affinity Resin, Clontech, Palo Alto, USA) und anschließender Gelfiltration über Superdex 75 HiLoad (Amersham Pharmacia), erhalten.
- ii. Calcitonin human RSA-Konjugat (0,5 µg/Vertiefung, Fa. Bachem, Prod. Nr.: H-2250).
- iii. Kalcacalcin human (PDN-21) RSA-Konjugat (0,5 µg/Vertiefung, Fa. Peninsula, Prod. Nr.: 6004).
- iv. Calcitonin N-Terminal Flanking Peptide RSA-Konjugat (0,5 µg/Vertiefung, Fa. Bachem, Prod. Nr.: H-3076) = humanes N-Procalcitonin

[0083] Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1

Bestimmung der Antikörperspezifität durch Auswertung der Mikrotiterplatten am BEP II (Behring-ELISA-Prozessor II) bei 450 nm

Hybrid/Klon	Extinktion bei 450 nm					
	Peptid 1	Peptid 2	Rekombinantes humanes Procalcitonin	Calcitonin	Katacalcin	N-Procalcitonin
98-47/44	0,975	negativ	0,100	0,561	2,5	negativ
98-31/04	negativ	1,715	0,290	negativ	negativ	negativ
98-31/74	negativ	2,374	negativ	0,118	0,149	negativ

negativ = Extinktion 450 nm < 0,1 bzw. bei Verdünnung des untersuchten Hybride keine Abstufung des Signals

## d) Klonierung

[0084] Einzelne Zellen von Hybriden, die die erfindungsgemäßen Antikörper produzieren (Bindung an humanes pCT nicht jedoch an freies Calcitonin, freies Katacalcin und freies N-Procalcitonin), wurden mit einem Mikromanipulator (Fa. Leitz, Wetzlar, Deutschland) kloniert. Der so erhaltene Klon 98-31/04 wurde am 16.12.1999 bei der DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, Braunschweig, Deutschland, unter der Eingangsnummer DSM ACC2437 hinterlegt.

## e) Bestimmung der Antikörpersubklasse

[0085] Die Subklasse des Antikörpers 98-31/04 wurde mittels IsoStrip™-Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit der Fa. Boehringer Mannheim, Deutschland als IgG<sub>1</sub> bestimmt.

## f) Produktion der Antikörper

[0086] Für die Produktion größerer Mengen Antikörper werden die entsprechenden Zellklone in Rollerflaschen (Fa. Corning Costar Deutschland, Bodenheim) überführt, und bis zum gewünschten Endvolumen bei +37°C expandiert. Danach wird die Rollerkultur-Suspension zur Entfernung der Zellen über 0,22 µm filtriert. Die jetzt zellfreie Antikörperlösung wird über Ultrafilter (Trenngrenze 30 000 Dalton) ankonzentriert und anschließend aufgereinigt.

## g) Reinigung der Antikörper

[0087] Die erhaltene Antikörperlösung wird gegen 0,14 M Phosphatpuffer pH 8,6 umgepuffert und auf ein mit rProtein A Sepharose Fast Flow (Fa. Amersham Pharmacia) gefüllte Chromatographiesäule aufgetragen (pro 10 mg zu reinigender Antikörper werden 1 ml rProtein A Sepharose Fast Flow eingesetzt). Alle nicht gebundenen Komponenten werden durch Waschen der Säule mit 0,14 M Phosphatpuffer pH 8,6 entfernt. Der gebundene Antikörper wird mit 0,1 M Zitronensäure pH 3,0 von der Säule eluiert und gegen 0,05 M Natriumacetat + 0,5 M NaCl + 0,05 M Tris + 0,01% Natriumazid pH 7,0 dialysiert.

## 4. Beispiel

## Nachweis von pCT in einer Probe

## a) Bindung von MAK an Latexpartikel

[0088] An Latexpartikel hergestellt nach EP-0 246 446 mit einem Durchmesser von 250 bis 310 nm wurde jeweils ein erfindungsgemäßer monoklonaler Antikörper und ein gegen Katalcalin gerichteter monoklonaler Antikörper gebunden; [0089] Das verwendete Latexpolymerisat wurde mit dest. Wasser auf einen Feststoffgehalt von 4 Gew.-% verdünnt. Die zu bindenden Antikörper wurden mit 0,05 M Natriumacetat + 0,5 M NaCl + 0,05 M Tris + 0,01% Natriumazid pH 7,0 auf einen Proteingehalt von 5 mg/ml verdünnt. 1 ml des obengenannten Polymerisats wurde mit 200 µl Antikörper-Lösung gemischt. Dann wurden 0,050 ml einer 20%igen Lösung von Tween 20 (Fa. Merck Eurolab, Darmstadt, Deutschland) hinzugegeben und das Ganze nochmals gemischt. Hierzu wurde 0,025 ml 1 N HCl zugegeben, so daß ein pH-Wert von ca. 3 erreicht wurde. Nach einer Inkubationszeit von 30 min. bei Raumtemperatur wurde 0,25 ml 1 M Phosphatpuffer pH 6,5 und 0,25 ml Natriumcyanborhydrid-Lösung (25 mg/ml) hinzugesetzt und gut durchgemischt. Anschließend erfolgte eine Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur. Dieser Beladungsansatz wurde sodann 30 min; bei ca. 50 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Der Rückstand wurde in 4 ml Imidazolpuffer pH 8,1 (5 g/L Imidazol, 40 g/L Saccharose, 1 g/L Humanalbumin) resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Ultraschall-Behandlung (Bronson Sonyfier B1%) für 30 Sekunden. Das so redispersierte Reagenz wurde im Volumenverhältnis 1 : 7,5 mit dem zuvor genannten Imidazolpuffer verdünnt und nochmals 30 Sekunden mit Ultraschall behandelt.

## b) Nachweis von pCT

[0090] Die nach Beispiel 4a) durch Bindung des erfindungsgemäßen Antikörpers und des Antikörpers gegen Katalcalin an Latexpartikel hergestellten Reagenzien wurden in einem Volumenverhältnis 1+1 gemischt und zur Messung von pCT in Patientenserum an Behring Nephelometer Analyser (BNA, Dade Behring, Marburg, Deutschland) eingesetzt. Das gemischte Reagenz wird bei Mischung mit pCT-haltigen Proben agglutiniert. Die Intensität des Streulichts im BNA ist von der pCT-Konzentration der Probe abhängig. Zur Messung wurden 100 µl Probe (1 Normals Serum, 3 pCT-haltige Patientenproben (BRAHMS LUMitest® PCT, > 100 ng/ml pCT)) mit 100 µl N-Diluens (Dade Behring, Marburg, Deutschland) und mit 40 µl des gemischten Reagenzes in der Reaktionskuvette gemischt und nach 12 min. die Veränderung des Meßsignals (n Bit) am BNA gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2

Probe	Meßsignal BNA in Bit
Normalserum	-58
pCT-haltiges Serum 1	212
pCT-haltiges Serum 2	197
pCT-haltiges Serum 3	592

# DE 100 41 215 A 1

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Dade Behring Marburg GmbH

<120> GEGEN PROCALCITONIN GERICHTETE ANTIKÖRPER; IHRE  
HERSTELLUNG U. VERWENDUNG

<130> MA1237

<140> 100 41 215,7

<141> 2000-08-22

<150> 19962417.8

<151> 1999-12-22

<150> 10016277.0

<151> 2000-04-03

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Arg Ser Lys Arg Cys Gly

1 5

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asp Ser Pro Arg Ser Lys Arg Cys Gly Asn Leu Ser

1 5 10

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3



1309709535639

Pro Gly Lys Lys Arg Asp

1

5

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo. sapiens

&lt;400&gt; 4

Val Gly Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Met Ser Ser

1

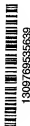
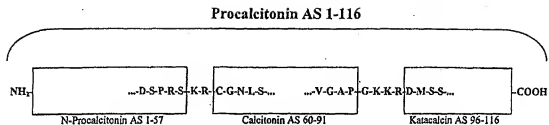
5

10

## Patentansprüche

- 1: Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper Procalcitonin nicht jedoch freies Calcitonin, freies Katalcalcin und freies N-Procalcitonin bindet.
- 2: Antikörper nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper an ein Peptid mit der Aminosäuresequenz Asp-Ser-Pro-Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser oder der Aminosäuresequenz Val-Gly-Ala-Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Asp-Met-Ser-Ser bindet.
- 3: Antikörper nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper von der Hybridomazelllinie 98-31/04 (DSM ACC2437) produziert wird.
- 4: Spezifischer Bindungspartner, dadurch gekennzeichnet, daß er an ein Epitop bindet, das von einem Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1-3 erkannt wird.
- 5: Antikörper oder spezifischer Bindungspartner nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper und/oder der spezifische Bindungspartner mit einer Festphase und/oder einer Komponente eines signalbildenden Systems assoziiert sind.
- 6: Antikörper oder spezifischer Bindungspartner nach einem der Ansprüche 1-4 zur Verwendung als in vitro oder in vivo Diagnostikum oder als Bestandteil eines in vitro oder in vivo Diagnostikums.
- 7: Antikörper oder spezifischer Bindungspartner nach einem der Ansprüche 1-4 zur Verwendung in einem Verfahren zum quantitativen oder qualitativen Nachweis eines Analyten, bevorzugt Procalcitonin, in einer Probe.
- 8: Antikörper oder spezifischer Bindungspartner nach einem der Ansprüche 1-4 zur Verwendung in der Affinitätschromatographie.
- 9: Antikörper oder spezifischer Bindungspartner nach einem der Ansprüche 1-4 in einem pharmazeutisch verträglichen, sterilen Injektionsmedium.
- 10: Antikörper oder spezifischer Bindungspartner nach einem der Ansprüche 1-4 zur Verwendung als Arzneimittel oder als Bestandteil eines Arzneimittels.
- 11: Antikörper oder spezifischer Bindungspartner nach einem der Ansprüche 1-4 zur Behandlung der Sepsis, des SIRS und/oder von Tumoren.
- 12: Testkit enthaltend einen oder mehrere Antikörper und/oder einen oder mehrere spezifische Bindungspartner nach einem der Ansprüche 1-5.
- 13: Arzneimittel enthaltend einen oder mehrere Antikörper und/oder einen oder mehrere spezifische Bindungspartner nach einem der Ansprüche 1-4.
- 14: Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß zur Immunisierung ein oder mehrere Peptide verwendet werden, die die Aminosäuresequenz Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly, bevorzugt die Aminosäuresequenz Asp-Ser-Pro-Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser, und/oder die Aminosäuresequenz Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Asp, bevorzugt die Aminosäuresequenz Val-Gly-Ala-Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Asp-Met-Ser-Ser, enthalten.
- 15: Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eines der zur Immunisierung verwendeten Peptide ein Oligopeptid, vorzugsweise ein trägergebundenes Oligopeptid, ist.
- 16: Tierische, pflanzliche oder prokaryontische Zelle sowie isolierte menschliche Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß diese Antikörper nach einem der Ansprüche 1-3 produziert.
- 17: Hybridomazelllinie, dadurch gekennzeichnet, daß diese Antikörper nach einem der Ansprüche 1-3 produziert.
- 18: Hybridomazelllinie nach Anspruch 17 mit der Bezeichnung 98-31/04, die bei der DSMZ unter der Eingangsnummer DSM ACC2437 hinterlegt wurde.
- 19: Peptid mit der Aminosäuresequenz Asp-Ser-Pro-Arg-Ser-Lys-Arg-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser.
- 20: Peptid mit der Aminosäuresequenz Val-Gly-Ala-Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-Asp-Met-Ser-Ser.

FIG 1



1308769535639